

**SYNTHESIS OF PHOSPHOROAMIDITE****Publication number:** JP62051695**Publication date:** 1987-03-06**Inventor:** TANAKA TOSHIKI; TAMATSUKURI SHIGERU;  
IKEHARA MORIO**Applicant:** YUKI GOSEI YAKUHHIN KOGYO KK**Classification:****- international:** C07H19/10; C07H1/02; C07H19/20; C07H21/00;  
C07H19/10; C07H1/00; C07H19/00; C07H21/00;  
C07H19/00; (IPC1-7): C07H19/10; C07H19/20;  
C07H21/00**- european:****Application number:** JP19850191507 19850829**Priority number(s):** JP19850191507 19850829**Report a data error here****Abstract of JP62051695**

**PURPOSE:** To obtain the titled compound useful as a synthetic raw material for oligonucleotide in high yield, enabling the free and easy introduction of a phosphoric acid protecting group, by phosphatizing a nucleoside with a specific phosphatizing agent and reacting with an alcohol, etc. **CONSTITUTION:** The objective compound of formula (B is nucleic acid base residue which may have protecting group; R<2> is OH-protecting group) can be produced by (1) reacting phosphorus trichloride with diisopropylamine to obtain N,N-diisopropylaminophosphodichloridite as a phosphatizing agent, (2) reacting the phosphatizing agent with a nucleoside having protected 5'-OH group to phosphatize the 3'-OH group and (3) reacting the obtained reaction intermediate with an alcohol, phenol, thiol or amine of formula R<1>-XH [X is O, S or NH; R<1> is (substituted) alkyl or aryl which can protect phosphoric acid group]. The compound of formula containing P-S bond or P-N bond is novel.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-51695

⑪ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)3月6日

C 07 H 19/10  
19/20  
21/00

7306-4C

7306-4C

7306-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 ホスホロアミダイト類の合成法

⑮ 特 願 昭60-191507

⑯ 出 願 昭60(1985)8月29日

⑰ 発 明 者 田 中 俊 樹 大阪市淀川区宮原2-1-37-404

⑱ 発 明 者 玉 造 滋 吹田市山田西2-9 A1-112

⑲ 発 明 者 池 原 森 男 高槻市日吉台3-11-14

⑳ 出 願 人 有機合成薬品工業株式 東京都中央区京橋2丁目17番4号  
会社

㉑ 代 理 人 弁理士 月 村 茂 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ホスホロアミダイト類の合成法

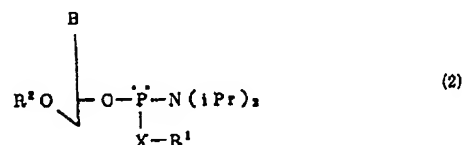
## 2. 特許請求の範囲

1. 三塩化リンとジイソプロピルアミンを反応させて得られるリン酸化剤N,N-ジイソプロピルアミノホスホジクロリダイトと、3'-位水酸基を保護基により保護したヌクレオシドとを反応させて、該ヌクレオシドの3'-位水酸基をリン酸化したのち、一般式(1)



(式中、XはO、SまたはNHを、R<sup>1</sup>は置換基を有することもあるアルキル基またはアリール基であり、リン酸保護基となりうる基を表わす)

で示されるアルコール類、フェノール類、チオール類もしくはアミン類のいずれかと反応させて一般式(2)



(式中、Bは保護基を有することもある核塩基残基を、R<sup>2</sup>は水酸基の保護基を、iPrはイソプロピル基を、XおよびR<sup>1</sup>は前記と同一の意味を表わす)

で示されるホスホロアミダイト類を合成することを特徴とするホスホロアミダイト類の合成法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はホスファイト法によるオリゴヌクレオチド合成に必要なホスホロアミダイト類の簡便な合成法に関する。

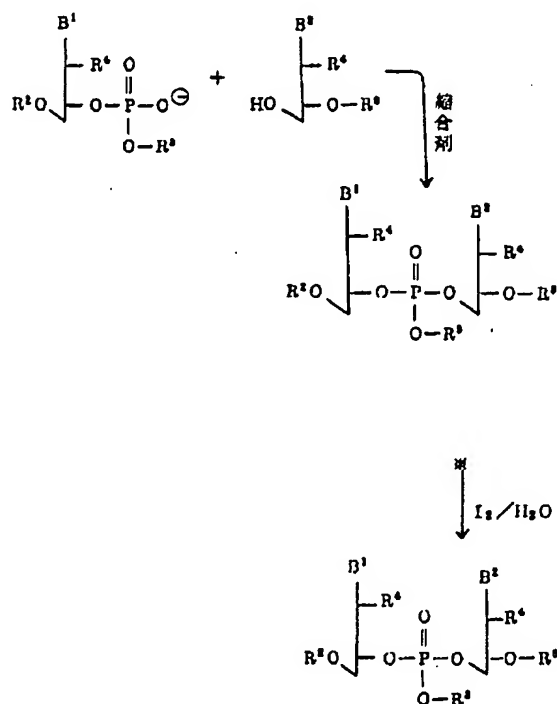
本発明により得られるホスホロアミダイト類は、遺伝子工学における重要な素材であるオリゴヌクレオチドを合成するための原料として、

きわめて有用な化合物である。

(従来の技術)

従来オリゴヌクレオチドの合成法としては、ヌクレオシドの3'-位と他のヌクレオシドの5'-位とをリン酸エステル形で結合させる縮合反応の種類によつて、トリエステル法、ジエステル法、ホスファイト法などが知られている。これらの縮合反応のうちトリエステル法は下記の反応式〔I〕

反応式〔I〕



(反応式〔I〕において、 $\text{B}^1$ 、 $\text{B}^2$ 、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ は前記と同一の意味を、 $\text{R}^3$ はクロール基またはテトラゾール基を要する)

で示されるように、ホスファイト体はすでに活性化されているため縮合剤を必要とせず、従つて縮合剤による副反応もおこらず、反応も数分間で完結するという利点を有する。

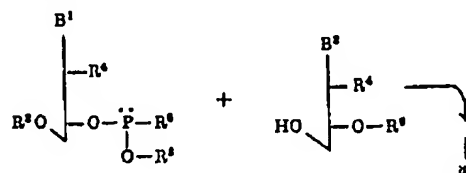
(発明が解決しようとする問題点)

ホスファイト法によるオリゴヌクレオチド合成は、レッツェンゲル(Letsinger)らにより提案〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ(Journal of the American Chemical Society), 98, 3655 (1976)]

(反応式〔I〕において、 $\text{B}^1$ および $\text{B}^2$ は保護基を有することもある核酸塩基残基を、 $\text{R}^1$ は水酸基の保護基を、 $\text{R}^2$ はリン酸の保護基を、 $\text{R}^4$ は水素原子または保護基を有する水酸基を、 $\text{R}^5$ は水酸基の保護基を要する)

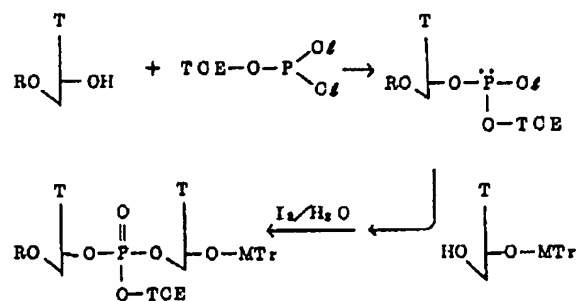
で示されるように、縮合剤の存在下にヌクレオシド3'-リン酸エステルとヌクレオシド5'-アルコールを縮合させてリン酸トリエステルとする反応であり、反応収率、反応の容易さなどの点から現在比較的多く用いられている合成法であるが、反応速度が遅く、また縮合剤による5'-位水酸基のスルホニル化という副反応のため、収率が低下するなどの欠点を有している。これに対してホスファイト法による縮合反応は下記の反応式〔II〕

反応式〔II〕



されたもので、下記の反応式〔II〕

反応式〔II〕

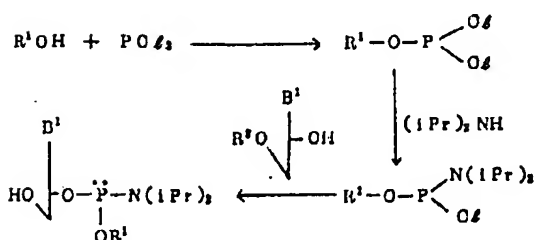
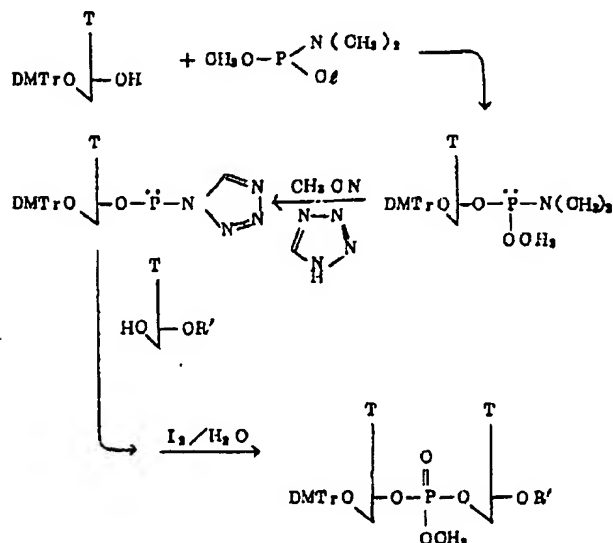


(反応式〔II〕において、 $\text{R}$ は2-フェノキシアセチル基を、 $\text{TOE}$ は2,2,2-トリクロロエチル基を、 $\text{MTr}$ はメトキシトリチル基を、 $\text{T}$ はチミンを要する)

で示されるように、5'-位水酸基を2-フェノキシアセチル基で保護したチミンにリン酸化剤(トリクロロエチルジクロリダイト)を反応させてホスホロアミダイトとしたのち、このホスホロアミダイトと3'-位水酸基をメトキシト

リチル基で保護したチミジンとを反応し、次いでヨウ素-水により酸化してチミジンのダイマーを得ている。しかし、このリン酸化剤は湿気に対して非常に不安定であるため、カルーテル (Caruthers) もは下記の反応式 [IV]

反応式 [IV]



(反応式 [V] において、iPr はイソプロピル基を、R<sup>1</sup> は置換基を有することもあるアルキル基またはアリール基でありリン酸保護基となりうる基を、B<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は前記と同一の意味を表わす)

で示すように、まず脂肪族または芳香族アルコールと三塩化リンを反応させてジクロリダイト体とし、次いでジイソプロピルアミンと反応させて得られたリン酸化剤を、5'-位水酸基を保護したヌクレオシドと反応させてホスホロアミダイトとするものであり、この方法では得られたホスホロアミダイトのリン酸保護基 R<sup>1</sup> が、リン酸化剤合成に用いるアルコールに対応して決

(反応式 [IV] において、DMTr はジメトキシトリチル基を、R<sup>1</sup> は 4-オキソパレリル基を、T は前記と同一の意味を表わす)

で示すように、反応式 [I] で用いたリン酸化剤のクロル基の 1 つをジメチルアミノ基に代えたリン酸化剤を、5'-位水酸基をジメトキシトリチル基で保護したチミジンと反応させてチミジン-ホスホロアミダイトを得ている。このホスホロアミダイトは比較的安定であり、抽出操作により精製することが可能である。このホスホロアミダイトはテトラゾールにより活性化したのち次の縮合反応に用いられる [テトラヘドロソ・レターズ (Tetrahedron Letters), 1859 (1981)]。なお、現在はジメチルアミノ基の代わりにジイソプロピルアミノ基を導入したホスホロアミダイトが一般に用いられている。

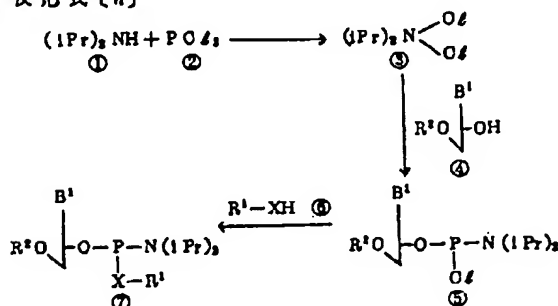
すなわち、現在通常に用いられているホスホロアミダイトの合成法では、下記の反応式 [V] 反応式 [V]

定されるため、1 種類のリン酸化剤からは 1 種類のリン酸保護基をもつホスホロアミダイトしか合成できず、従つてホスホロアミダイトのリン酸保護基に対応する数だけのリン酸化剤を必要とする。またこの方法ではリン酸保護基として導入される保護基 R<sup>1</sup> の種類も限定されるという問題点を有する。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは上記の如き問題点を解決するために検討を加えた結果、下記の反応式 [VI] に示すホスホロアミダイトの新規な合成法を見出し、本発明を完成したものである。

反応式 [VI]



(反応式[V])において、XはO、SまたはNHを、 $B^1$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ および $iPr$ は前記と同一の意味を與わす)

すなわち、ジイソプロピルアミンと三塩化リンを反応させてリン酸化剤(N,N-ジイソプロピルアミノホスホジクロリダイト)を合成したのち、このリン酸化剤を用いて $\beta'$ -位水酸基を保護したヌクレオシドの $\beta'$ -位水酸基のリン酸化を行い、引続き対応するアルコール類、フェノール類、チオール類もしくはアミン類のいずれかと反応させることで、リン酸保護基 $R^1$ を自由に選択し、かつ容易に導入することを可能にしたものである。

さらに本発明を上記の反応式[V]により具体的に説明すると、三塩化リン②と2当量のジイソプロピルアミン③とを、エーテル溶液中、反応温度10℃以下で1~5時間反応する。反応終了後、析出した塩を分別し、母液を常圧で蒸留してエーテルを留去したのち、オイル状の残渣を更に減圧蒸留して無色透明液体のリン酸化

剤N,N-ジイソプロピルアミノホスホジクロリダイト④が得られる。次に、このリン酸化剤④と、 $\beta'$ -位水酸基を保護基 $R^2$ 例えばトリチル基、メトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基などの脱保護反応のさい選択的に脱離する保護基により保護したヌクレオシド⑤とを、ジイソプロピルエチルアミンの存在下に、-10℃前後の低温で15~60分間反応を行い、ヌクレオシド⑤の $\beta'$ -位水酸基をリン酸化した反応中間体⑥とする。次いで、この反応中間体⑥を単離することなく、引続き一般式(I)



(式中、 $R^1$ およびXは前記と同一の意味を與わす)

で示される化合物⑦とを、ジイソプロピルエチルアミンの存在下に、室温で15~60分間反応させることで、リン酸保護基 $R^1$ を導入したホスホロアミダイト⑧が好収率で得られる。なお、一般式(I)において、 $R^1$ は置換基を有することもあるアルキル基またはアリール基であり、リン

酸保護基となり得るものである。従つて一般式(I)で示される化合物⑦としては、アルコール類、フェノール類、チオール類もしくはアミン類が用いられ、代表的なものとしてはメタノール、2-シアノエタノール、トリクロロエタノール、トリクロロジメチルエタノール、クロロフェノール、ベンゼンチオール、p-ニトロベンゼンチオール、アニリンなどが例示されるが、本発明の目的を達成する化合物であればこれらに限定されるものではない。

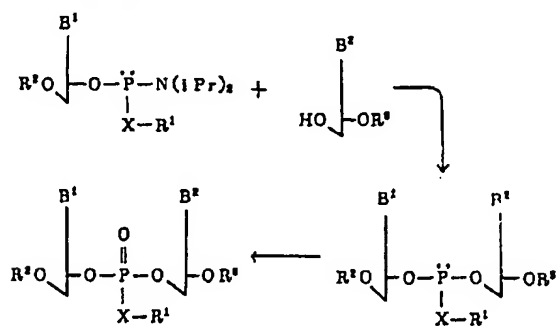
また、本発明におけるヌクレオシド⑤は $\beta'$ -位が水素原子である $\beta'$ -デオキシリボヌクレオシドのほか、 $\beta'$ -位が水酸基であるリボヌクレオシドの場合も、 $\beta'$ -位水酸基を適切な保護基により保護することにより、 $\beta'$ -デオキシリボヌクレオシドと同様に用いることができる。

また、本発明の如き合成法をとることにより、従来のホスホロアミダイトはP-O結合によりリン酸保護基が結合しているのみであつたのに対し、本発明ではP-O結合のほかP-S結合、

P-N結合によるリン酸保護基の結合を可能としたものであり、P-S結合、P-N結合を有するホスホロアミダイトは新規な化合物である。

さらに本発明で得られたホスホロアミダイトを用い、下記の反応式[VI]

反応式[VI]



(反応式[VI]において、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $iPr$ は前記と同一の意味を與わす)

で示すように、ホスホロアミダイト $\beta'$ -位水酸基を保護したヌクレオシドとをアセトニトリル中テトラゾールの存在下に縮合反応を行い、次

いでヨウ素一水で酸化して完全保護したジヌクレオチドを得る。このジヌクレオチドの保護基を選択的に部分脱離し、更に縮合反応をくり返すことにより、鎖長が2個以上のオリゴヌクレオチドを合成することができる。

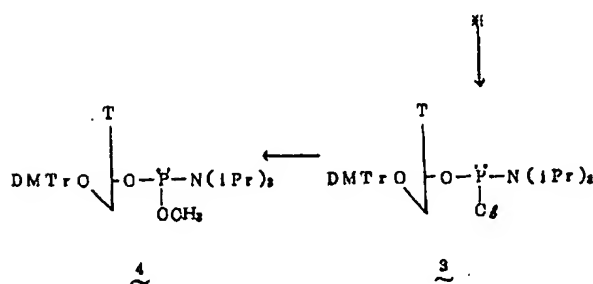
(発明の効果)

本発明で用いるリン酸化剤N, N-ジイソプロピルアミノホスホジクロリダイトは、三塩化リンとジイソプロピルアミンより容易に合成でき、従来のリン酸化剤に比して保存安定性が良好である。また、本発明のホスホアミダイトの合成法は、従来の合成法では導入しにくかつたリン酸保護基を容易に導入可能にすると共に、従来得られなかつたP-S結合、P-N結合によるリン酸保護基の結合を可能としたものである。

(実施例および実験例)

実施例1

①リン酸化剤(N, N-ジイソプロピルアミノホスホジクロリダイト)の合成



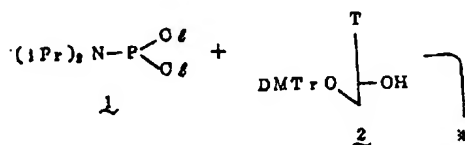
乾燥ジクロロメタン2 mlおよび乾燥N, N-ジイソプロピルエチルアミン1 ml中に、前記①で得たリン酸化剤1 450 μlを溶解し、食塩一水で-10℃に冷却、窒素雰囲気下で攪拌しながら、乾燥ジクロロメタン3 mlに溶解した5'-O-ジメトキシトリチルチミジン2 0.6 mmolを10分間で滴下した。滴下終了後約30分間攪拌を続けてリン酸化反応を行い、反応中間体3とする。反応中間体3を含む反応液中に、乾燥ジクロロメタン3 mlに溶解したメタノール10当量を滴下したのち、室温で30分間攪拌を続けてリン酸保護基としてメトキシ基を有するチミジン-アミ

三塩化リン2 1.8 ml(0.25モル)を含む乾燥エーテル100 mlを塩化ナトリウム氷で約-10℃に冷却した中へ、攪拌しながら乾燥エーテル70 mlに溶解したジイソプロピルアミン70.1 ml(0.5モル)を、約25時間を要して滴下する。滴下終了後、反応液の温度を室温まで戻し、更に1時間攪拌を続けて反応を完結させる。次いで析出した塩を分別し、母液を常圧で蒸留してエーテルを留去する。更に黄色オイル状の残渣を減圧蒸留して、無色透明液体のN, N-ジイソプロピルアミノホスホジクロリダイトを87%の収率で得た。

沸点 72~73℃/7 mmHg

<sup>31</sup>P-NMR スペクトルを第1図に示す。

②チミジン-ホスホアミダイトの合成



ダイト4を得た。このチミジン-アミダイト4はシリカゲルカラム(φ2cm×5cm)(メルクタイプ60)でジクロロメタン/酢酸エチル/トリエチルアミン=50/50/2(V/V/V)により精製した。収率76%。

実施例2~9

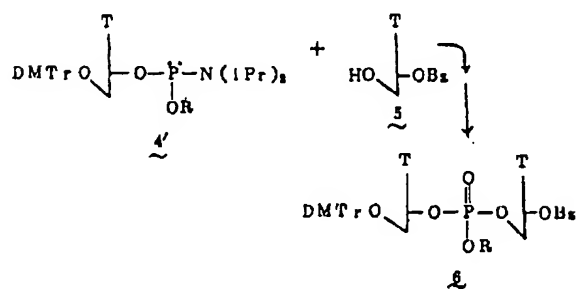
実施例1-②で得られた反応中間体3に、実施例1-②のメタノールの代りに第1表記載のアルコール、フェノール、チオフェノール、アニリン(以下、アルコール等と総称)それぞれ10当量を実施例1-②と同じ条件で反応させ、精製して、用いたアルコール等に対応するリン酸保護基を有するチミジン-アミダイトを第1表記載の収率で得た。代表的なアミダイトの<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを第2~4図に示す。

(以下余白)

第1表

実施例	アルコール等	収率(%)
2	$\text{O}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ (0)	81
3	$\text{ONCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	57
4	$\text{O}_2\text{CCH}_2\text{OH}$	67
5	$\text{O}_2\text{COC}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	57
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$	70
7	$\text{C}_6\text{H}_5\text{SH}$	38
8	$\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SH}$ (P)	49
9	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	64

実施例1～5 ジヌクレオチドの合成



第2表

実験例	アミダイト4'のリン酸保護基R	ジヌクレオチド収率(%)
1	$-\text{CH}_3$	88
2	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$ (0)	67
3	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ON}$	70
4	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OO}_2$	53
5	$-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	77

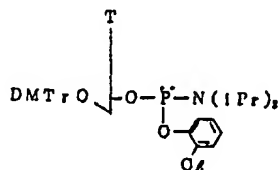
## 4 図面の簡単な説明

第1図はリン酸化剤  $\text{O}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{P}-\text{N}(\text{iPr})_2$  の<sup>31</sup>P

-NMRスペクトルを示す。

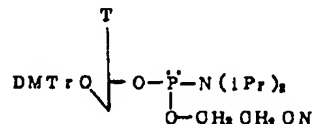
第2図はそれぞれ次のチミジン-アミダイトの<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを示す。

第2図

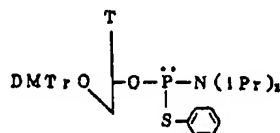


前記実施例で得られたチミジン-アミダイト4' (リン酸保護基Rは第2表に記載) 0.15 mmolと3'-O-ベンゾイル-チミジン5 0.1 mmolを合わせてピリジン共沸し、窒素置換したのち、アセトニトリル3 mlに溶解したテトラゾール1.5 mmolを加えて、室温で30分間縮合反応を行う。次に室温下に0.1 Mヨウ素(テトラヒドロフラン/ピリジン/水=40/10/1)をヨウ素の色が持続するまで加え、更に30分間撹拌して酸化を行う。反応の進行はそれぞれの段階において、TLC(クロロホルム/メタノール=10/1)あるいはRTLC(アセトン/水=7/3)で確認した。酸化反応終了後、ジクロロメタン-5%亜硫酸水素ナトリウム水溶液で抽出し、有機層を水で2回洗浄したのち濃縮する。残渣をシリカゲルカラム(メルクタイプ60H)により精製し、少量のクロロホルムに溶解したのちn-ペンタンに滴下して粉末化したジヌクレオチドを第2表記載の収率で得た。

第3図



第4図



特許出願人 有機合成薬品工業株式会社  
代理人 弁理士 月村 茂 外1名

